DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.024
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)23-2123-02

论著

Ca^{2+}-CaM在M_3R介导逼尿肌细胞收缩中作用的实验研究

卢根生,任 静,宋 波,熊恩庆,金锡御 (第三军医大学附属西南医院全军泌尿专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨Ca^{2+}-CaM在M_3R介导逼尿肌细胞收缩中作用。方法 将原代培养逼尿肌细胞分为实验组和对照组,接种于6孔培养板上培养,加入10^{-4}mol/L carbachol和methoctramine,采用Ca^{2+}浓度和CaM活性检测试剂盒分别测定Ca^{2+}浓度和CaM活性。结果 实验组中,[Ca^{2+}]i和CaM的平均通道荧光对数值分别为(3.26±0.38)和(2.87±0.34),与对照组[分别为(2.06±0.12)、(2.14±0.24)]相比,均有显著性的升高($P<0.05$)。结论 Ca^{2+}-CaM信号传导途径参与了M_3R介导逼尿肌细胞收缩调节过程。

关键词:逼尿肌细胞;毒蕈碱受体亚型;M_3R;钙离子;钙调蛋白
中图法分类号:R322.62;R329.26;R334.3 文献标识码:A

Roles of Ca^{2+}-CaM in M3R-mediated detrusor cell contraction

LU Gen-sheng, REN Jing, SONG Bo, XIONG En-qing, JIN Xi-yu (Center for Urology of PLA, Southwest Hospital, Third Military University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the roles of Ca^{2+}-CaM in M3R-mediated detrusor contraction. **Methods** The primary cultured detrusor cells divided into experiment and control groups were inoculated in 6-hole plate, and then 10^{-4}M carbachol and methoctramine were added. The Ca^{2+} concentrations and CaM activity were detected by Ca^{2+} Test Kit and CaM Test Kit. **Results** The Mean Channel Fluorescence values (lg) of Ca^{2+} and CaM were (3.26±0.38) and (2.87±0.34) in the experiment group, respectively, and (2.06±0.12) and (2.14±0.24) in the control group, respectively. Significant difference was found between the experiment group and the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Ca^{2+}-CaM signal transduction pathway participates in the regulation of M3R-mediated detrusor cell contraction.

Key words: detrusor cell; muscarinic receptor subtype; M3R; Ca^{2+}; CaM

毒蕈碱受体(Muscarinic receptor, MR)在调节逼尿肌细胞收缩过程中起重要作用,其受体亚型-M_3R直接介导逼尿肌细胞收缩[1]。Ca^{2+}是刺激逼尿肌细胞收缩的直接因素,Ca^{2+}有数十种受体结合蛋白质,Ca^{2+}通过与不同受体蛋白结合调节不同反应。目前尚不清楚M_3R介导逼尿肌细胞收缩的具体机制。本研究通过carbachol激活M_3R后,检测逼尿肌细胞内Ca^{2+}浓度和钙调蛋白(CaM)的活性,探讨Ca^{2+}、CaM在M_3R介导逼尿肌细胞收缩中的作用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770471)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(39770471)
作者简介:卢根生(1965-),男,湖北省黄冈县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事膀胱癌、膀胱功能障碍性疾病方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754265
收稿日期:2003-06-08;修回日期:2003-10-12

1 材料与方法

1.1 材料

Carbachol(毒蕈碱受体-MR激动剂)、methoctramine(毒蕈碱受体亚型-M_2R拮抗剂)、Ca^{2+}检测试剂盒、CaM检测试剂盒均由美国Sigma公司提供。

1.2 方法

1.2.1 原代逼尿肌细胞及分组 原代逼尿肌细胞培养及鉴定根据文献[2]方法进行。取培养细胞接种于6孔培养板上培养。细胞分2组:实验组和对照组。实验组培养细胞70%融合时加入10^{-4}mol/L carbachol和methoctramine,37 ℃孵育30 min备用。

1.2.2 胞浆游离钙离子浓度[Ca^{2+}]i测定 用Ca^{2+}荧光探针Fluo-3/AM标记逼尿肌细胞,流式细胞仪检测细胞平均通道荧光强度。具体方法步骤为:以bufferA 2 ml洗涤细胞,2 000 r/min离心5 min,共2次。吸去上清液,管内再加入buffer A 200 μl,混匀细胞,然后加入Fluo-3/AM 40μl,避光保存0.4μl,室

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

温避光放置 30 min。吸去上清液，加 buffer B 2 ml 洗涤细胞，2 000 r/min 离心 5 min，共 2 次。吸去上清液后，在管内加入 buffer B 1 ml，在流式细胞仪上检测平均通道荧光对数值。激发波长 488 nm，发射波长 530 nm。

1.2.3 逼尿肌细胞内游离 CaM 活性测定 取培养细胞，加入无钙 PBS 液，洗涤 2 次，然后加入 0.1 mmol/L 三氟啦嗪(TFP)，充分悬浮后倒入玻璃皿内，连续震荡并在 250～256 nm 紫外光下照射 20 min，2 000 r/min 离心 5 min，分离收集细胞，加入 0.5 ml 无钙 PBS，混匀后流式细胞仪测定平均通道荧光强度，数值以对数值表示。激发波长 488 nm，发射波长 530 nm。

1.3 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

2 结果

实验组中，[Ca^{2+}]i 和 CaM 的平均通道荧光对数值分别为(3.26±0.38)和(2.87±0.34)；对照组[Ca^{2+}]i 和 CaM 的平均通道荧光对数值分别为(2.06±0.12)、(2.14±0.24)，两者之间均有显著性差异($P<0.05$)。

表1 Carbachol 刺激后细胞内[Ca^{2+}]i 浓度、CaM 活性变化($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab 1 Changes of cytosolic free Ca^{2+} concentration and CaM activity in cultured detrusor cells($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Mean channel fluorescence value(lg)	[Ca^{2+}]i	CaM activity
Control	2.06±0.12	2.14±0.24
Experiment	3.26±0.38 *	2.87±0.34 *

*: $P<0.05$ *vs* control

3 讨论

胆碱能神经在逼尿肌功能调节过程中起着非常重要的作用。乙酰胆碱(Ach)通过与逼尿肌细胞表面的胆碱能受体(MR)结合，引起肌细胞收缩等一系列生物反应。研究显示，MR 有 5 种受体亚型-M_1R、M_2R、M_3R、M_4R 和 M_5R，但是膀胱逼尿肌细胞膜上只有两种 MR 亚型-M_2R、M_3R，而没有其余的受体亚型存在，介导逼尿肌细胞收缩的主要是 M_3R。研究表明，M_3R 与配体结合后激活 G 蛋白，形成配体-受体-G 蛋白复合物，刺激磷脂酰肌醇(PI)周转加速，产生第二信使分子——三磷酸肌醇(IP3)和二酰甘油(DAG)。IP3、DG 进一步促进逼尿肌细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高[3,4]。

Ca^{2+} 作为次级信使分子在逼尿肌收缩过程中起关键作用。正常情况下胞浆[Ca^{2+}]i 约为胞外 Ca^{2+} 浓度的几十万分之一，此谓钙稳态。其形成与维持是细胞功能正常发挥的必要条件，它是胞外钙内流、胞内钙释放、钙排出胞外和钙转入钙库储存综合动态平衡的结果，当胞浆[Ca^{2+}]i 增加时，这种低钙稳定状态平衡被打破，引起逼尿肌收缩。Ca^{2+} 有数十种受体结合蛋白质，Ca^{2+} 通过与不同受体蛋白结合调节不同反应[5]。到目前为止 Ca^{2+} 引起逼尿肌细胞收缩的机制尚不清楚。

本实验中，carbachol 刺激逼尿肌细胞，methoctramine 阻断 carbachol 对 M_2R 的作用，当 M_3R 激活后，胞内 Ca^{2+} 非常显著升高，CaM 活性也显著升高。此实验我们从 Ca^{2+} 含量的角度来证实，M_3R 是通过 Ca^{2+} 依赖平滑肌收缩机制介导逼尿肌收缩的；而 CaM 活性相应增加说明 Ca^{2+} 是通过 CaM 起作用，而不是以肌钙蛋白为受体，使肌动蛋白构象发生改变，从而与肌球蛋白结合，激活肌球蛋白头部 ATP 酶，使肌肉产生收缩。当胞内 Ca^{2+} 浓度升高，浓度超过 10^{-7} mol/L 时，Ca^{2+} 与 CaM 按 4∶1 的比例结合，形成 Ca-CaM 复合物，激活肌球蛋白轻链激酶(MLCK)，使 20×10^3 的肌球蛋白轻链(MLC)第 19 位丝氨酸磷酸化，活化肌球蛋白 Mg-ATP 酶，ATP 分解提供能量，导致横桥摆动产生收缩[6,7]。本研究证实了 Ca^{2+}-CaM 信号传导途径参与了 M_3R 介导逼尿肌细胞收缩调节过程。

参考文献：

[1] Krichevsky V P, Pagala M K, Vaydovsky I. Function of M3 muscarinic receptors in the rat urinary bladder following partial outlet obstruction[J]. J Urol, 1999, 161(5): 1644－1647.

[2] 卢根生，宋 波，金锡御，等. M_3R 介导逼尿肌细胞收缩与信使分子 IP3 关系的实验研究[J]. 中国现代医学杂志，2002，12(24)：33－34.

[3] An J Y, Yun H S, Lee Y P. The intracellular pathway of the acetylcholine-induced contraction in cat detrusor muscle cells[J]. Br J Pharmacol, 2002, 137(7): 1001－1110.

[4] Hegde S S, Eglen R M. Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder[J]. Life Sci, 1999, 64(6－7): 419－424.

[5] Kajioka S, Nakayama S, McMurray G. Ca^{2+} channel properties in smooth muscle cells of the urinary bladder from pig and human[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 43(1－3): 19－29.

[6] Wallis R M, Napier C M. Muscarinic antagonists in development for disorders of smooth muscle function[J]. Life Sci, 1999, 64(6－7): 395－399.

[7] Chapple C R, Yamanishi T, Chess Williams R. Muscarinic receptor subtypes and management of the overactive bladder[J]. Urology, 2002, 60(5 Suppl 1): 82－88.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net